

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-119170

(P2002-119170A)

(43)公開日 平成14年4月23日 (2002.4.23)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト ⁸ (参考)
A 01 K 67/027		A 01 K 67/027	4 B 0 2 4
// C 12 N 9/16		C 12 N 9/16	Z 4 B 0 5 0
15/09	Z N A	15/00	Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数7 O L (全 23 頁)

(21)出願番号	特願2000-318271(P2000-318271)	(71)出願人	000206956 大塚製薬株式会社 東京都千代田区神田司町2丁目9番地
(22)出願日	平成12年10月18日 (2000.10.18)	(72)発明者	武田 聖 徳島県徳島市川内町竹須賀87-5
		(72)発明者	近藤 万里 徳島県板野郡藍住町乙瀬字青木74-9
		(72)発明者	金本 尚秀 徳島県板野郡北島町中村字寺裏8-1-303
		(74)代理人	100065215 弁理士 三枝 英二 (外8名)

最終頁に統く

(54)【発明の名称】 U B E 2 G 1 遺伝子欠損非ヒト動物

(57)【要約】

【課題】ユビキチン結合酵素 (UBE 2 G 1) の生理的な役割、特にその骨格筋への作用を明らかにし、骨格筋において該酵素が関与する種々の病態を解明するかあるいは該病態を治療する方法を研究するために有用なモデル動物、すなわち UBE 2 G 1 遺伝子欠損非ヒト動物を提供する。

【解決手段】ユビキチン結合酵素 UBE 2 G 1 をコードする UBE 2 G 1 遺伝子の全部若しくは一部が欠失、または任意部位に他の遺伝子が挿入若しくは置換されたことにより、実質的にユビキチン結合酵素活性を喪失した UBE 2 G 遺伝子を含むユビキチン結合酵素遺伝子欠損非ヒト動物。

【特許請求の範囲】

【請求項1】ユビキチン結合酵素UBE2G1をコードするUBE2G1遺伝子の全部若しくは一部が欠失、または任意部位に他の遺伝子が挿入若しくは置換されたことにより、ユビキチン結合酵素活性を実質的に喪失してなるUBE2G1遺伝子欠損非ヒト動物。

【請求項2】欠失した遺伝子がUBE2G1遺伝子の第2のエクソンである請求項1に記載の非ヒト動物。

【請求項3】他の遺伝子がネオマイシン耐性遺伝子である請求項1に記載のUBE2G1遺伝子欠損非ヒト動物。

【請求項4】ホモ欠損型またはヘテロ欠損型である、請求項1乃至3のいずれかに記載のUBE2G1遺伝子欠損非ヒト動物。

【請求項5】ホモ欠損型である、請求項1乃至3のいずれかに記載のUBE2G1遺伝子欠損非ヒト動物。

【請求項6】腎糸球体硬化モデル動物である請求項5に記載のUBE2G1遺伝子欠損非ヒト動物。

【請求項7】非ヒト動物がマウスである請求項1乃至6のいずれかに記載のUBE2G1遺伝子欠損非ヒト動物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ユビキチン結合酵素をコードする遺伝子を欠損することによって、ユビキチン結合酵素活性を実質的に喪失してなる非ヒト哺乳動物に関する。

【0002】

【従来の技術】遺伝子工学技術によって単離され、クローン化された様々な遺伝子の機能を明らかにする上で、近年そのクローン化された遺伝子の生物体内での生理学的機能の解析や遺伝子疾患のモデル系として、本来その生物に備わっていない外来性の遺伝形質を人為的に付加、あるいはその生物が持っている内在性の遺伝形質の発現を抑制する方法が開発されるに至り、様々な形質転換動物が作り出され、この形質転換動物を利用した実験や研究が盛んになっている。

【0003】従来より、胚幹細胞(Embryonic stem cell: ES細胞)に形質転換遺伝子を注入すると胚体の形成に参加してキメラ動物を形成することができる性質を利用して、様々な遺伝子変異動物の作出が試みられている(Evans, M.J. and Kaufman, M.H., *Nature*, 292, 154 (1981))。そしてその後、胚幹細胞を利用した遺伝子欠損マウスの作製とこれを用いた研究が急速に進展している(Bradley, et al., *Nature*, 309, 255 (1984); Thomas & Capecchi, *Cell*, 51, 503 (1987); Koller, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 8927 (1989))。また上記の遺伝子変異マウスの作製には、胚幹細胞株の樹立が必要とされ、その大部分が129系のマウスより樹立されている(ES-D3細胞; Doetschman, J. *Embryo. Exp.*

Mol. Ph., 87, 27 (1981); CCE細胞; Robertson, *Nature*, 323, 445 (1986); BL/6III細胞; Ledermann, and Burki, *Exp. Cell Res.*, 197, 254 (1986))。このような胚幹細胞を用いて作出された遺伝子発現不全動物としては、Hprt遺伝子欠損マウス(Hooper, et al., *Nature*, 326, 292 (1987); Knehn, et al., *Nature*, 326, 295 (1987)、癌抑制遺伝子の一つであるp53を欠失したp53欠損マウス(Donehower, et al., *Nature*, 356, 215 (1992))、β2ミクログロブリン遺伝子変異マウス(Zijlstra, et al., *Nature*, 344, 742 (1990))、免疫疾患モデルマウスのRAG-2 (V(D)J recombination activation gene)変異マウス(Sinkai, et al., *Cell*, 68, 855 (1992))、等が報告されている。近年では、アングiotensinogen遺伝子欠損動物(特開平8-131021号公報)、線維芽細胞及び軟骨細胞によって分泌されるマトリックスメタロエンドプロティナーゼの酵素一種であるストロメリシンの欠失したストロメリシン-1欠損トランスジェニックマウス(特表平8-507925号公報)、免疫系疾患、及び骨形成異常のモデル動物として使用可能なTREB5遺伝子の一部をネオマイシン耐性遺伝子に置換されたTREB5遺伝子欠損マウス(特開平8-140527号公報)、リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素遺伝子の、そのエクソンIIからエクソンVがネオマイシン耐性遺伝子に置換されたL-PGDS遺伝子欠損マウス(特開平11-332417号公報)、マウスのCD4及びCD8の発現を欠くようヒトCD4をコードする転写遺伝子とHLA-DG座の対立遺伝子をコードする転写遺伝子によって置換された敗血症モデルとなるダブルノックアウト遺伝子組換え非ヒト哺乳動物(特開平9-500025号公報)、ミエロペルオキシダーゼ遺伝子機能欠損マウス(特開2000-116280号公報)等、本来生物に保有されている遺伝子を欠損するかまたは他の遺伝子で置換された様々な非ヒト動物が作成されている。上記変異マウスの作製方法はこの分野の当業者にとって既に通常の技術であり、この改変技術(野田哲生編、実験医学、増刊, 14 (20) (1996)、羊土社)に記載されている。

【0004】一方、蛋白質が量的にも質的にも適正な状態に維持されることは細胞の諸機能を制御するうえで極めて重要である。ユビキチンシステムは基質蛋白質を選択的にユビキチン化し、プロテアソーム分解へと導く系であり、代謝・細胞周期・形態形成・神経機能・免疫応答などさまざまな生命現象に深く関与していることが知られている。このシステムは酵母からヒトに至るまで、生物種を超えて高度に保存されており、次のような過程からなる。すなわち、ユビキチンはユビキチン活性化酵素(UBE1またはUBA)とATPによってC末端のGly残基がアデニル化され、UBE1の特定のCys残基にチオエステル結合する。次いで活性化されたユビキチンはユビキチン結合酵素(UBE2またはUBC)

の特定のCys残基に転移してチオエステル結合する。基質蛋白質のユビキチン化はUBE2から直接的に行われる場合と、ユビキチナーゼ（UBE3またはUBR）を介して行われる場合とがあり、いずれも基質蛋白質のLys残基にユビキチンがイソペプチド結合する。さらに、基質蛋白質に結合したユビキチン分子内のLys残基にユビキチンが次々に結合してポリユビキチン鎖が形成され、最終的に基質蛋白質はプロテアソームで分解される。ユビキチン結合酵素であるUBE2とユビキチナーゼであるUBE3は遺伝子ファミリーを形成し、それぞれ特定の蛋白質を基質とすることによって、ユビキチンシステムの選択性あるいは特異性が規定されていると理解されている。

【0005】本発明者らは、先にヒトcDNAクローンを大量解析する過程において、ユビキチン結合酵素UBE2の一つと考えられる新規酵素の遺伝子を単離し、この酵素をUBE2Gと名付けた(特開平9-308492号公報)。ノーザンプロット解析において、ヒトUBE2GのmRNAは骨格筋で強く発現するほか、調べた全ての組織で微弱な発現が検出された。推定されたアミノ酸配列は170アミノ酸残基からなり、全長にわたって酵母及び線虫のUBC7とそれぞれ52%及び76%の割合で一致し、ユビキチン結合酵素(UBE2)活性に必須とされるCys残基も保存されていた。また組換え蛋白質を用いた実験により、UBE2GがUBE1依存的にユビキチンとチオエステル結合することが示された。よってこれらのことから、UBE2Gが新規のユビキチン結合酵素であることが確認された。なお、当該明細書においては、かかるユビキチン結合酵素UBE2GをUBE2G1と、該酵素をコードする遺伝子をUBE2G1遺伝子と称する。

【0006】UBE2G1は、骨格筋において特に強く発現するが、試験した全ての組織において非常に弱く発現された。また、全ての他のユビキチン結合酵素(UBE2)は細胞サイクルの調節のような必須の細胞機能に関係しており、それらは組織のいたるところに発現している。しかしながら、UBE2G1は、筋特異的蛋白の分解に関与しており、該遺伝子の不全は、結果として筋ジストロフィーのような疾患になると考えられた。

【0007】しかし、これらの作用についても十分に解明されておらず、UBE2G1の生体内における働きについては解明すべき点が数多く残されている。UBE2G1の生体における作用を解明していくうえで、UBE2G1を全く産生しないか若しくは少量しか産生しないような、所謂UBE2G1遺伝子発現不全動物のモデルが有用として渴望されるが、現時点においてこのような動物モデルは作出されていない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、UBE2G1の生理的な役割、特にその骨格筋への作用を明らかに

し、骨格筋においてUBE2G1が関与する種々の病態を解明するかあるいは該病態を治療する方法を研究するために有用なモデル動物、すなわちUBE2G1遺伝子欠損非ヒト動物を提供することを目的とする。また本発明は、腎糸球体硬化モデルとして上記UBE2G1遺伝子欠損非ヒト動物を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために日夜鋭意研究を行っていたところ、遺伝子操作を用いてヒトユビキチン結合酵素(UBE2G1)遺伝子を特異的に破壊する特定のベクターを構築し、これと相同的組換えを起こさせることにより、UBE2G1遺伝子が破壊され、その結果、ユビキチン結合酵素活性を喪失した非ヒト動物が得られることを見出した。具体的には、本発明者らは、UBE2G1遺伝子のマウスにおける相同遺伝子を用いて、UBE2G1遺伝子を特異的に破壊する特定のベクターを構築し、これを発生学的に全能性をもつ未分化細胞に導入し、次いでUBE2G1遺伝子が破壊された細胞を選抜して動物胚へ注入し、仮親の子宫に移植して生殖系列のキメラ動物を取得し、このキメラ動物を正常な動物と交配させてヘテロ欠損型動物(+/-)を作出し、さらにヘテロ欠損型同士を交配させることにより、ホモ欠損型動物(-/-)、すなわち遺伝子座の双方ともUBE2G1を実質的にコードしない改変UBE2G1遺伝子を有する、目的のトランスジェニック非ヒト動物が得られることを確認した。本発明は、かかる知見に基づいて完成されたものであり、下記(1)～(7)に掲げる発明を包含するものである：

(1) ユビキチン結合酵素UBE2G1をコードするUBE2G1遺伝子の全部若しくは一部が消失、または任意部位に他の遺伝子が挿入若しくは置換されたことにより、ユビキチン結合酵素活性を実質的に喪失してなるUBE2G1遺伝子欠損非ヒト動物。

(2) 欠失した遺伝子がUBE2G1遺伝子の第2のエクソンである(1)に記載のUBE2G1遺伝子欠損非ヒト動物。

(3) 他の遺伝子がネオマイシン耐性遺伝子である(1)に記載のUBE2G1遺伝子欠損非ヒト動物。

(4) ホモ欠損型またはヘテロ欠損型である、(1)乃至(3)いずれかに記載のUBE2G1遺伝子欠損非ヒト動物。

(5) ホモ欠損型である(1)乃至(3)のいずれかに記載のUBE2G1遺伝子欠損非ヒト動物。

(6) 腎糸球体硬化モデル動物である(5)に記載のUBE2G1遺伝子欠損非ヒト動物。

(7) 非ヒト動物がマウスである(1)乃至(6)のいずれかに記載のUBE2G1遺伝子欠損非ヒト動物。

【0010】

【発明の実施の形態】以下、本明細書におけるアミノ

酸、ペプチド、塩基配列、核酸等の略号による表示は、IUPAC-IUBの規定〔IUPAC-IUB Communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138: 9 (1984)〕、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」(特許庁編)及び当該分野における慣用記号に従うものとする。

【0011】また、DNAの合成、外因性遺伝子を含有するベクター(発現ベクター)の製造、該ベクターによって形質転換された宿主細胞及び宿主細胞が分泌する発現蛋白の製造方法などは、一般的遺伝子工学的手法に従うか若しくはそれらに準じて容易に行うことができる〔Molecular Cloning 2d Ed, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989); 純生化学実験講座「遺伝子研究法 I, II, III」、日本生化学会編 (1986) など参照〕。

【0012】本発明において遺伝子とは、2本鎖DNAのみならず、それを構成するセンス鎖及びアンチセンス鎖といった各1本鎖DNAをいずれも包含する趣旨で用いられ、またその長さに何ら制限されるものではない。従って、本発明の遺伝子には、特に言及しない限り、哺乳動物のゲノムDNAを含む2本鎖DNA、及びcDNAを含む1本鎖DNA(センス鎖)、並びに該センス鎖と相補的な配列を有する1本鎖DNA(アンチセンス鎖)、およびそれらの断片のいずれもが含まれる。

【0013】また、本発明において遺伝子とは、リーダ配列、コード領域、エキソン及びインtron等の別を問うものではなく、いずれも包含するものである。またポリヌクレオチドとしては、RNA及びDNAが例示される。DNAにはcDNA、ゲノムDNA及び合成DNAがいずれも含まれ、また特定のアミノ酸配列からなる(ポリ)ペプチドには、その同等効果物(同族体、誘導体、変異体)がいずれも含まれる。

【0014】なお、変異体(遺伝子、(ポリ)ペプチド)には、天然において突然変異や翻訳後の修飾等によって生じる変異体(例えばアレル変異体)、天然由来の遺伝子又は(ポリ)ペプチドの配列の任意部位を人為的に欠失、置換または、付加(若しくは挿入)させることによって作成する変異体が含まれる。

【0015】本発明でいうUBE2G1遺伝子は、ユビキチン結合酵素UBE2G1をコードする非ヒトの遺伝子であり、一例として配列番号1に示すアミノ酸配列からなるユビキチン結合酵素UBE2G1をコードするマウスの遺伝子を挙げることができる。但し、ユビキチン結合酵素UBE2G1は、配列番号1に示すアミノ酸配列に限定されることなく、当該ユビキチン結合酵素と同一の活性を有する相同物をも包含するものである。ここで「UBE2G1の相同物」とは、UBE2G1と配列相同性を有し、構造的特徴並びに遺伝子発現パターンにおける共通性、及び生物学的機能の類似性によりひとつのファミリーと認識される一連の関連蛋白質を意味し、アレル体(対立遺伝子)から生成される一連の蛋白質も

含まれる。また、UBE2G1の相同物には、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するUBE2G1と同一活性を有する、哺乳動物、例えばヒト、ウマ、ヒツジ、ウシ、イヌ、サル、ネコ、クマ、ラット、ウサギなどのげっ歯類動物に由来する蛋白質も包含される。

【0016】UBE2G1遺伝子の具体的な態様としては、配列番号2に示される塩基配列を有する遺伝子が例示できる。かかる塩基配列は、配列番号1に示されるアミノ酸配列の各アミノ酸残基を示すコドンの一つの組合せ例である。コドンの繰り重ね端みれば、UBE2G1遺伝子は、かかる特定の塩基配列を有する遺伝子に限らず、各アミノ酸残基に対して任意のコドンを組合せ、選択した塩基配列を有することも可能である。コドンの選択は、常法に従うことができ、例えば利用する宿主のコドン使用頻度などを考慮することができる〔Nucleic Acids Res., 9, 43 (1981)〕。

【0017】UBE2G1遺伝子は、本発明により開示されたUBE2G1遺伝子の配列情報に基づいて、一般的遺伝子工学的手法により容易に製造・取得することができる〔Molecular Cloning 2d Ed, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989); 純生化学実験講座「遺伝子研究法 I, II, III」、日本生化学会編 (1986) など参照〕。

【0018】具体的には、UBE2G1遺伝子が発現される適当な起源より、常法に従ってcDNAライブラリーを調製し、該ライブラリーから、UBE2G1遺伝子に特有の適当なプローブや抗体を用いて所望クローニングを選択することにより実施できる〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 78, 6613 (1981); Science, 222, 778 (1983)など〕。

【0019】上記において、cDNAの起源としては、UBE2G1遺伝子を発現する各種の細胞、組織やこれらに由来する培養細胞などが例示される。また、これから全RNAの分離、mRNAの分離や精製、cDNAの取得とそのクローニングなどはいずれも常法に従って実施することができる。また、cDNAライブラリーは市販されてもおり、本発明においてはそれらcDNAライブラリー、例えばクローニングテック社(Clontech Lab. Inc.)などより市販されている各種cDNAライブラリーなどを用いることができる。

【0020】UBE2G1遺伝子をcDNAライブラリーからスクリーニングする方法も、特に制限されず、通常の方法に従うことができる。

【0021】具体的には、例えばcDNAによって產生される蛋白質に対して、該蛋白質の特異抗体を使用した免疫的スクリーニングにより対応するcDNAクローニングを選択する方法、目的のDNA配列に選択的に結合するプローブを用いたブラークハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーションなどやこれらの組合せなどを例示できる。

【0022】ここで用いられるプローブとしては、UBE2G1遺伝子の塩基配列に関する情報をもとにして化学合成されたDNAなどが一般的に使用できるが、既に取得されたUBE2G1遺伝子やその断片も良好に利用できる。また、UBE2G1遺伝子の塩基配列情報に基づき設定したセンス・プライマー、アンチセンス・プライマーをスクリーニング用プローブとして用いることもできる。

【0023】前記プローブとして用いられるヌクレオチド配列は、配列番号2に対応する部分ヌクレオチド配列であって、少なくとも15個の連続した塩基、好ましくは20個の連続した塩基、より好ましくは30個の連続した塩基、最も好ましくは50個の連続した塩基を有するものも含まれる、或いは前記配列を有する陽性クローニング自体をプローブとして用いることも出来る。

【0024】UBE2G1遺伝子の取得に際しては、PCR法〔Science, 230, 1350 (1985)〕によるDNA/RNA增幅法が好適に利用できる。殊に、ライブラリーから全長のcDNAが得られ難いような場合には、RACE法〔Rapid amplification of cDNA ends; 実験医学, 12(6), 35 (1994)〕、特に5'-RACE法〔M.A. F. rohman, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 8, 89 98 (1988)〕などの採用が好適である。

【0025】かかるPCR法の採用に際して使用されるプライマーは、本発明によって明らかにされたUBE2G1遺伝子の配列情報に基づいて適宜設定でき、これは常法に従って合成できる。尚、増幅させたDNA/RNA断片の単離精製は、前記の通り常法に従うことができ、例えばゲル電気泳動法などによればよい。

【0026】また、上記で得られるUBE2G1遺伝子或いは各種DNA断片は、常法、例えばジデオキシ法〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 74, 5463 (1977)〕やマキサム-ギルバート法〔Methods in Enzymology, 65, 499 (1980)〕などに従って、また簡便には市販のシークエンスキットなどを用いて、その塩基配列を決定することができる。

【0027】本発明が対象とするユビキチン結合酵素(UBE2G1)活性を喪失したUBE2G1遺伝子欠損非ヒト動物とは、ヒト以外の哺乳動物のUBE2G1ゲノム遺伝子に人为的に変異(消失、置換、付加、挿入)を加えることにより、該遺伝子の発現能が抑制乃至は喪失するか、若しくは該遺伝子がコードするUBE2G1の活性が実質的に抑制乃至は喪失することによって、実質的にユビキチン結合酵素(UBE2G1)活性を発現しない非ヒト動物(以下、ノックアウト動物ともいう)である。

【0028】ここで、非ヒト動物としては、動物モデルを作出するうえで、個体発生及び生涯のサイクルが短くかつ繁殖が比較的容易なマウス、ラット等のゲッ歯動物が好ましいが、特にこれに限定されるものではなく、ヒ

ト以外のウサギ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウシ等の哺乳類の動物もこれに含まれる。

【0029】上記でいうUBE2G1ゲノム遺伝子に人为的に変異を加える方法としては、遺伝子工学的手法により該遺伝子の塩基配列の全部を消失するか、コドンの読み取り枠をずらしたりプロモーターあるいはエキソンの機能を破壊するように、上記ゲノム遺伝子の塩基配列の一部を消失したり、または任意の部位に他遺伝子を挿入するか、または他遺伝子で置換することによって行なうことができる。上記人為的変異方法は、例えばサイトスペシフィック・ミュータゲネシス〔Methods in Enzymology, 154, 350, 367-382 (1987) ; 同 100, 468 (1983) ; Nucleic Acids Res., 12, 9441 (1984) ; 続生化学実験講座1「遺伝子研究法II」、日本生化学会編, p105 (1986) 〕などの遺伝子工学的手法、リン酸トリエステル法やリン酸アミダイト法などの化学合成手段〔J. Am. Chem. Soc., 89, 4801 (1967) ; 同91, 3350 (1969) ; Science, 150, 178 (1968) ; Tetrahedron Lett., 22, 18 59 (1981) ; 同 24, 245 (1983) 〕及びそれらの組合せることによって実施できる。

【0030】より具体的には、本発明のノックアウト動物は、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物のUBE2G1ゲノム遺伝子を単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子(以下、neoという)、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子あるいはlac Z(β-ガラクトシダーゼ遺伝子)、CAT(クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子)を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のインtron部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列(例えば、polyA付加シグナルなど)を挿入し、完全なMessenger RNAを合成できなくすることによって結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖(以下、ターゲティングベクターと略する)を、例えばエレクトロポレーション法により該動物細胞の染色体に導入し、得られた組み換え胚幹細胞についてUBE2G1遺伝子上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲティングベクター上のDNA配列とターゲティングベクター作製に使用したUBE2G1遺伝子以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法による解析によりUBE2G1ノックアウト胚幹細胞を選別することにより得ることができる。

【0031】上記において他の遺伝子を挿入する場合、UBE2G1遺伝子の変異を検出するための選択マーカーとしても機能する他の遺伝子を挿入することが好ましく、このような遺伝子としては、ネオマイシン耐性遺伝子(neo)が好ましく例示できる。この場合、組み換えが生じたことがネオマイシン(あるいはそのアナログであるG418)耐性の獲得により判定可能となる。さ

らにランダム組み換え体を除くため、ポジティブネガティブ選別が可能となるように相同部位の外側にジフテリア毒素A断片遺伝子（以下「DT-A」という）のような、細胞に対して致死性を有する遺伝子を導入することが望ましい。こうして得られるターゲティングベクターはランダム組み換えにより致死性遺伝子が導入され、このような細胞は致死となる。したがって、ポジティブネガティブ選別を行うことにより相同組み換え体を効率的に取得することが可能となる。これらの遺伝子の挿入は、試験管内で常用のDNA組換え技法により行うことができる。

【0032】本発明の実施にあたっては、UBE 2G 1遺伝子の第2エキソンが欠失しており、その欠失領域に選択マーカー遺伝子が挿入されていることが好ましい。本発明においては、具体的には、ポジティブ選択マーカーとしてMC 1-neo-p o 1 y A (MC 1プロモーター(Polyoma virus由来変異エンハンサー配列およびチミジンキナーゼ遺伝子プロモーター配列からなるプロモーター)の下流にネオマイシン耐性遺伝子とSV40由来ポリA付加シグナルを連結したもの: Thomas, K.R. & Capecchi, M.R.: Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells.: Cell, 51, 503 (1987)、及びネガティブ選択マーカーとして、MC 1-DT-A (MC 1プロモーターの下流にジフテリア毒素A断片が連結されたもの: Yagi, T. et al.: A novel negative selection for homologous recombinants using diphtheria toxin A fragment: Analyt Biochem., 214, 70, (1993) が好適に使用される。

【0033】上記操作において、マウスUBE 2G 1ゲノム遺伝子は、例えば公知のヒトUBE 2G 1 cDNA配列(特開平9-308492号の実施例7、配列番号23(ヒトUBE 2GのORF領域)に相当)をプローブとしてマウスゲノムDNAライブラリーをスクリーニングし、蛋白質コード領域を含む陽性クローニングする、これをベクターに挿入後、制限酵素で消化し、特定のエキソンを含む染色体DNAをサブクローニングすることによって取得できる。

【0034】マウスゲノムDNAライブラリーの作成は、例えば、ラボマニュアル遺伝子工学(丸善株式会社発行、村松正實編、1990)100-112頁記載の方法に従って行うことができ、またマウスUBE 2G 1 cDNAの作成は、例えば、ラボマニュアル遺伝子工学(丸善株式会社発行、村松正實編、1990)83-99頁記載の方法に従って行うことができる。

【0035】また、マウスUBE 2G 1がヒトUBE 2G 1の相同物であるかどうかの一確認法としては、ラディエーション・ハイブリッド・マッピング(Radiation Hybrid Mapping)によって、マウスUBE 2G 1 cDNAクローンの染色体マッピングを行ない(Cox, D.R., et al., Science, 250, 245-250 (1990))、マウスUBE

2G 1遺伝子の染色体座位と、ヒト相同遺伝子が存在する染色体座位が相同領域であるかどうかで判断するとよい。

【0036】またマウス胚幹細胞への遺伝子導入が129系の培養胚幹細胞が大部分であることを考慮するとゲノムDNAクローンの取得には129/Svマウス由来ゲノムライブラリー(ストラタジーン社製: Stratagene)を上記で得られたマウスUBE 2G 1 cDNAクローンをプローブとして用いるのがより好ましい。

【0037】かくして、上記ライブラリーより第2エクソンを含むゲノムDNAクローンを得、これを用いてターゲティングベクターの作製のために目的とする遺伝子領域の構造を破壊する。本発明の後記具体例においては、相同領域として第2エクソン上流のPst I-Eco R V断片(0.8kb)および下流のXba I-Eco RI断片(9.5kb)を、またポジティブ選択マーカーとしてMC 1-neo-p o 1 y A(ストラタジーン社製)、ネガティブ選択マーカーとしてMC 1-DT-A(ライフテックオリエンタル社製)をそれぞれ使用し、相同置換することができる。

【0038】尚、本発明のユビキチン結合酵素遺伝子欠損非ヒト動物作成のためのターゲットとなるマウスUBE 2G 1ゲノム遺伝子は少なくとも6つのエキソンからなる遺伝子であり、本発明の実施例においては第2のエキソン部分を含む領域をネオマイシン耐性遺伝子に相同置換させているが、他のエキソン部分のいずれか、或いは複数箇所エキソン部分を組み合わせてネオマイシン耐性遺伝子等の遺伝子に相同置換させるか、欠失させてもよい。

【0039】次いで、相同組換え法等によりUBE 2G 1遺伝子を不活化させる元の胚幹細胞としては、例えば前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知のエバンスとカウフマンの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。

【0040】例えば、マウスの胚幹細胞の場合、一般的には129系の胚幹細胞が使用されるが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに変わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかな胚幹細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF1マウス(C57BL/6とDBA/2とのF1)を用いて樹立したものなども良好に使用し得る。BDF1マウスは採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えてC57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスする事でその遺伝的背景をC57BL/6マウスに変える事が可能である点で有利に用い得る。

【0041】また、胚幹細胞を樹立する場合、一般には受精後3~5日目の胚盤胞を使用するが、それ以外に8

細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することも可能である。また、雌雄いずれの胚幹細胞を用いてもよいが、通常雄の胚幹細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。

【0042】胚幹細胞にターゲティングベクターを導入するには、胚幹細胞を生殖細胞への分化能を保つように未分化の状態で培養維持する必要がある。そのためには、培地に適当な栄養細胞をフィーダー細胞として加え、また、ヒトLIF (Leukemia Inhibitory Factor)を添加し、さらに牛胎仔血清、ヌクレオシド、非必須アミノ酸、2-メルカプトエタノールなどを添加して培養することを要する。栄養細胞としては、STO細胞、あるいはマウス胎仔線維芽細胞を好ましく例示できる。

【0043】フィーダー細胞の添加濃度は、 2.5×10^5 細胞/ m^2 (10ml/100mm培養皿、2ml/35mm培養皿、4ml/60mm培養皿、0.5ml/well : 24-well plate等の使用)が好ましい。ヒトLIFの添加濃度は、 10^3 ユニット/ ml が好ましいがそれ以上でもよい。牛胎仔血清の添加濃度は、20%、ヌクレオシドの添加濃度は10~30nMが好ましい。非必須アミノ酸としては、例えば、ギブコ社製の非必須アミノ酸溶液が好ましく、その濃度は各0.1 mMが好ましい。2-メルカプトエタノールの濃度は0.1 mMが好ましい。エレクトロポレーション法で胚幹細胞にターゲティングベクターを導入するには、胚幹細胞を一定の濃度になるように緩衝液に浮遊させ、適当な制限酵素で処理して線状化したターゲティングベクターを添加し、ECM600 (BTX社製)、あるいはジーンパルサー(バイオラド社製)等の適当なエレクトロポレーション装置を用い、例えば270V/ 1.8mm 、または250V/ 4mm 、及び $500\mu\text{F}$ Dでエレクトロポレーションを行うことが好ましい。緩衝液としては、PBS等を用いてpHを7.0に調整するのが好ましい。制限酵素はターゲティングベクターの制限酵素部位を考慮して選択する。

【0044】ターゲティングベクターを導入した後、胚幹細胞を上記の培地で24~48時間培養し、その後、G418 (ジェネティシン:Geneticin:ギブコBRL社製)を含む培地と交換する。1日ごとに新しいG418添加培地と交換し、約1週間培養を続ける。

【0045】上記ターゲティングベクターを導入して得られたG418抵抗性のクローンを拾い上げ、相同組み換え体を単離し、確認を行う。

【0046】まず、上記の薬剤耐性胚幹細胞を増殖させ、その一部からDNAを抽出する。相同組み換え体の検出は、前記のようにサザンハイブリダイゼーション法により確認する。

【0047】ゲノムDNAを抽出後、制限酵素処理を行い、アガロース電気泳動を行った後、UBE2G1遺伝子DNAをプローブにサザンハイブリダイゼーションを

行う。こうして、ターゲティングベクターの断片を検出できれば、その胚幹細胞は標的UBE2G1遺伝子の一方の対立遺伝子がターゲティングベクターと相同組み換えを起こしたクローンであることが証明されたことになる。

【0048】次いで生殖系のキメラ動物およびUBE2G1遺伝子の破壊された変異遺伝子を有するトランスジェニック非ヒト動物の作出は、以下のように行う。

【0049】まず、動物の胚に、ヘテロ欠損型胚幹細胞を注入し、仮親の子宮に移植する。ここで、動物の胚は、胚盤胞が用いられる。キメラの形成に好適だからである。胚幹細胞は通常約10~15個注入する。こうして、胚幹細胞を注入された胚は直ちに仮親の子宮に移植する。

【0050】上記の方法によって妊娠した仮親から生まれた子のうちキメラ動物を選ぶ。胚幹細胞の寄与率の高いキメラ動物は生殖系列のキメラ動物である可能性が高いが、キメラ動物を正常動物と交配することにより、生殖系列のキメラ動物であることの確認が可能である。生殖系列のキメラ動物と正常動物との交配によりヘテロ欠損型動物が得られ、ヘテロ欠損型同士の交配によりUBE2G1対立遺伝子の両方が破壊されたホモ欠損型動物を得ることができる。

【0051】このようにして得られたホモ欠損型動物であるトランスジェニック非ヒト動物は、腎糸球体病変の形成に重要な役割を持つUBE2G1を欠損しており、腎糸球体病変形成の疾患モデル動物、特に腎不全モデルとして利用できる。

【0052】本発明のUBE2G1遺伝子発現不全非ヒト動物は、UBE2G1遺伝子の不活性化により正常なUBE2G1遺伝子を有する同種の動物に対して、その遺伝子発現量が減退させられた非ヒト動物であり、例えば、病態動物モデル系の作製の面から個体発生及び生物サイクルが比較的短く、また繁殖が容易なマウス、ラット等のゲッケ動物が好ましいが、特にこれらに限らず例えば、ウサギ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ネコ等これに含まれる。

【0053】本発明のUBE2G1遺伝子発現不全(UBE2G1ノックアウト)非ヒト哺乳動物は、例えば前述のようにして作製したターゲティングベクターをマウス胚幹細胞あるいはマウス卵細胞に導入し、ターゲティングベクターの不活性化されたUBE2G1遺伝子断片が遺伝子相同組み換えによりマウス胚幹細胞あるいはマウス卵細胞の染色体上のUBE2G1遺伝子と入れ換わることによりUBE2G1遺伝子を破壊させることができる。

【0054】UBE2G1遺伝子が破壊された細胞は、前述のようにUBE2G1遺伝子上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲティングベクター上のDNA配列とターゲティングベクターに使用したマウスUBE2

G1遺伝子以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。

【0055】また、UBE2G1遺伝子を不活性化させる別の方法として、UBE2G1の構造遺伝子をレポーター遺伝子で置換されたUBE2G1発現非ヒト動物を得る方法が例示できる。該方法においては、レポーター遺伝子がUBE2G1のプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、UBE2G1プロモーターの活性を検出することができる。例えばUBE2G1タンパク質をコードする遺伝子領域の一部を大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子(1acZ)で置換している場合、本来UBE2G1の発現する組織でUBE2G1の代わりに β -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば β -プロモー4-クロロ-3-インドリル- β -ガラクトピラノシド(X-gal)のような β -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便にUBE2G1の動物生体内における発現状態を観察することが出来る。具体的には、UBE2G1欠損マウスあるいはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩液(PBS)で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温あるいは37°C付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって β -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い1acZ mRNAを検出してもよい。このような本発明のUBE2G1発現不全非ヒト動物は、UBE2G1プロモーターを活性化あるいは不活性する物質をスクリーニングするうえで極めて有用であり、UBE2G1発現不全に起因する腎不全などの各種疾患の原因究明あるいは治療薬の開発に大きく貢献しうる。

【0056】本発明の腎糸球体硬化形成による腎不全モデルは、イムノグロブリンの沈着ではなく、コラーゲン・タイプI V、ティネシンなどの細胞外基質が増加、および病変の進行した糸球体での α -平滑筋アクチンの発現の増加が見られることなどから、何らかの機序によってメサンギウム細胞が活性化され、細胞外基質の産生が亢進していると考えられる非ヒトモデル動物である。

【0057】糸球体は上皮細胞、内皮細胞、メサンギウム細胞、糸球体基底膜ならびにメサンギウム基質から構成されており、メサンギウム基質の増加は糸球体硬化と呼ばれ、最小動脈硬化症、糸球体腎炎、糖尿病性腎炎など、あらゆる糸球体障害の終局像として捉えられているが、その発症機序については充分に解明されていない。よって本発明のUBE2G1遺伝子欠損マウスは腎糸球体硬化の新しいモデルとして有用である。

【0058】

【発明の効果】本発明によって得られたUBE2G1遺伝子欠損非ヒト動物、特にホモ欠損型マウスは、腎糸球

体病変の形成に重要な役割を持つUBE2G1を欠損しており、腎糸球体病変形成の疾患モデル動物、特に腎不全モデルとして有効に利用できる。

【0059】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明がこれらに限定されることは言うまでもない。

実施例1

(1) UBE2G1遺伝子破壊用ベクターの作製

Genbankで公表されているマウスESTの中から、ヒトUBE2G遺伝子蛋白質コード領域の配列に類似した配列からなるものをBLASTプログラムにより検索し、それらをシークエンチャ (Gene Codes Corporation) を用いて連結してマウスUBE2G1 cDNAの仮想配列を決定した。この配列情報をもとに、オリゴスクレオチド423A12P7(配列番号4)及び423A12P8(配列番号5)を合成し、これらをプライマーとしてマウス骨格筋由来cDNA (Marathon-Ready cDNA, ストラタジーン社製) を鋳型としたPCR反応を行い、蛋白質コード領域を含むcDNAクローンを単離した。得られた該クローンをマウスUBE2G1 cDNAクローンと命名した。

【0060】マウスUBE2G1の遺伝子は、配列番号1に示す170アミノ酸配列からなる新規なユビキチン結合酵素をコードするORF領域を有している(510塩基配列、配列番号2)。尚、5'および3'非翻訳領域と蛋白質翻訳領域を含むcDNA配列(1274塩基)を配列番号3に示す。該マウスUBE2G1 cDNAクローンとヒトUBE2G cDNAクローンの相同性は核酸レベルで95%であり、推定されるアミノ酸配列は完全に一致した。

【0061】更にラディエーション・ハイブリッド・マッピング(Radiation Hybrid Mapping)によって、マウスUBE2G1 cDNAクローンの染色体マッピングを行なった(Cox, D.R., et al., Science, 250, 245-250 (1990))。

【0062】即ち、マウスT31ラディエーション・ハイブリッド・パネルをリサーチ・ジェネティックス社(Research Genetics, Inc., AL, U.S.A.)より購入し、製品の使用説明書に従い、下記に示す塩基配列からなるM423A12RH-P3プライマー(配列番号6)とM423A12RH-P6プライマー(配列番号7)を用いてPCR反応を実施した。

【0063】m423A12RH-P3プライマー:
5'-GACAATGATCTCTATCGTTG-3'

m423A12RH-P6プライマー: 5'-TGTTCACATA
TAACCTCACC-3'

得られた結果をインターネット上で使用可能なソフトウェアによって分析した(WI/MIT Mouse Radiation Hybrid Mapper (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/mou>

se#rh/rhmap-auto/rhmapper.cgi）。その結果、マウスUBE2G1遺伝子はマウス染色体マーカーD11Mit320近傍に位置し、この領域はヒト相同遺伝子が存在する染色体17p13のマウス染色体における相同領域であった。

【0064】以上の結果から、この遺伝子はマウスのUBE2G1遺伝子であると判断した。

【0065】(2) ターゲティングベクターの作製
ヒトUBE2G1遺伝子cDNAをプローブとして用いて129SV/マウス由来ゲノムライブラリー(ストラタジーン社製:Stratagene)をスクリーニングした結果、第2エクソンを含むゲノムDNAクローンが得られた。ターゲティングベクターの作製には、相同領域として第2エクソン上流のPstI-EcoRV断片(0.8kb)および下流のXbaI-EcoRI断片(9.5kb)を、またポジティブ選択マーカーとしてMC1Neop〇1yA(ライフテックオリエンタル社製)、ネガティブ選択マーカーとしてMC1プロモーターに連結したジフェリア毒素A断片遺伝子(ストラタジーン社製)をそれぞれ使用し、これをターゲティングベクターとして構築した(図2A参照)。

【0066】実施例2 UBE2G1遺伝子欠損マウスの作製

(1) マウス胚幹細胞の培養

実施例1により作製したマウスUBE2G1遺伝子のターゲティングベクターを導入する細胞として、129系マウス胚盤胞から樹立された胚幹細胞CCE株(ハーバード大学E.J.Robertson教授より入手)を用いた、また、胚幹細胞のフィーダー細胞としてneopで形質転換したSTO細胞(東京大学、勝木元也教授より入手)を用いた。胚幹細胞の培養は"Teratocarcinomas and embryonic stemcells: a practical approach, p.71-151, IRL Press, Oxford."(E.J.Robertson, 1987)に従って行った。

【0067】ダルベッコ改変イーグル培地(ライフテックオリエンタル社製)に44mM炭酸水素ナトリウム(ライフテックオリエンタル社製)を添加後、1N塩酸を加えてpH7.2に調整し、これを基礎培地とした。STO細胞の培養には、当該基礎培地に10%ウシ胎仔血清(ライフテックオリエンタル社製)およびペニシリン及びストレプトマイシン(それぞれ50単位/ml及び50μg/ml、ライフテックオリエンタル社製)を添加した培地を使用した。胚幹細胞の培養には、基礎培地に20%ウシ胎仔血清(ライフテックオリエンタル社製)、0.1mMβ-メルカプトエタノール、0.1mM非必須アミノ酸(ライフテックオリエンタル社製)、30nMアデノシン、30nMグアノシン、30nMシチジン、30nMウリジン、10nMチミジン(以上、全てシグマ社製)、およびESGRO(1000units/ml、アムラド社製; AMRAD)を添加した培地を使用した。

【0068】STO細胞は、100mm培養皿1枚あたり 1.2×10^5 細胞の濃度で播種し、一部を3日後に継代し、残りは4日後に2時間マイトマイシンC(10ng/ml、シグマ社製)で処理した後、 2.5×10^5 細胞/mlの濃度で培養皿に注ぎ(10ml/100mm培養皿、4ml/60mm培養皿、2ml/well:6-well plate、0.5ml/well:24-well plate)、その翌日からフィーダー細胞として使用した。胚幹細胞は 1.5×10^5 細胞/mlの濃度でフィーダー細胞上に播種し(10ml/100mm培養皿、4ml/60mm培養皿)、翌日に培地交換し、2日後に継代した。

【0069】(2) キメラマウス及びUBE2G1遺伝子破壊マウスの作製

CCE細胞を1mlのPBS(pH7.0)に浮遊させ、制限酵素SaiI消化により線状化したターゲティングベクター $50 \mu\text{g}$ をエレクトロポレーションによって 3.0×10^7 個の胚幹細胞に導入した。遺伝子導入に使用した機材はECM600(BTX Inc.社製)、条件は $270\text{V}/1.8\text{mm}$ および $500\mu\text{F}$ とした。導入後48時間にジェネティシン(Geneticin)(250μM、GibcoBRL社製:GibcoBRL)を添加して、以後薬剤選択を7日間行い、2161個のジェネティシン耐性コロニーの中から120クローニングを回収した。これらの胚幹細胞からゲノムDNAを抽出し、後述の5'プローブ、3'プローブおよびneopプローブを用いてサザンプロット解析を行った結果、7株が相同組換え体として同定された。これらのうち3株(クローニング番号9、38および115)をC57BL/6Jマウス胚盤胞へ注入し、キメラマウスを作製した。

【0070】即ち、上記のようなターゲティングにより一方のUBE2G1対立遺伝子が破壊されたCCE細胞をC57BL/6系マウス(日本クレア株式会社より入手)胚盤胞に注入し、仮親の子宮に移植した。ここでCCE細胞は、10~15個注入した。その結果、266個の胚を13匹の仮親に移植し、34匹の子を得た。毛色から、そのうち7匹がキメラマウスであった(雄4匹、雌3匹)。キメラマウスの雄とC57BL/6Jマウス(日本クレア株式会社より入手)の雌を戻し交配したところ、雄キメラマウスで生殖系列のキメラが確認され、一方のUBE2G1対立遺伝子がターゲティングにより破壊されたヘテロ欠損型マウス(+/-)を得た。ヘテロ欠損型マウス(+/-)の雄と雌を交配し、両方の対立遺伝子が破壊されたホモ欠損型マウス(-/-)を作製した。

【0071】表1に示すようにF1ヘテロマウス間交配によって得られたF2マウスの遺伝子型は、野生型マウス(+/-)64匹(雄37匹、雌27匹)、ヘテロ欠損型マウス(+/-)108匹(雄52匹、雌56匹)、及びホモ欠損型マウス(-/-)50匹(雄18匹、雌32匹)であった。

【0072】

【表1】

	+ / +	+ / -	- / -
♀	27	56	32
♂	37	52	18
合計	64	108	50

【0073】UBE2G1遺伝子ヘテロ欠損型マウス (+ / -) は正常に出生し、繁殖も可能であった。一方生後6週齢のUBE2G1遺伝子ホモ欠損型マウス (- / -) の体重は野生型 (+ / +) と比べて約20%小さく、6ヶ月齢になっても追いつくことはなかった(図3)。しかし、この点を除いて生後1年間にホモ欠損型マウス (- / -) と野生型マウス (+ / +) とでは外観上の違いはみられなかった。

【0074】得られたUBE2G1遺伝子ヘテロ欠損型マウスの受精卵は、茨城県つくば市東1丁目1番3号に所在する通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に平成12年8月24日付けで、寄託者が付した識別のための表示「UBE2G1cDNA由来受精卵」及び受託番号「FERMP-17997」として寄託されている(通知番号: 12生寄文第1114号)。

【0075】実施例3 遺伝子型の判定

遺伝子型の判定には、ターゲティングベクターの構築に使用した相同領域の上流に位置する5'プローブ (Spe I-Scal断片、0.6kb)、および相同領域の下流に位置する3'プローブ (EcoRI断片、1kb) を用いた。マウスゲノムDNAを制限酵素Kpn Iで消化し、常法 (Maniatis et al. 1990) に従ってサザンプロット・ハイブリダイゼーションを行った。このとき、野生型アレルは5'プローブまたは3'プローブのいずれにおいても21kbの断片として検出されるのに対して、変異型アレルは5'プローブでは7.5kb、3'プローブでは14.5kbの断片として検出された(図2、B)。

【0076】実施例4 ノーザンプロット解析

正常マウスの各組織におけるUBE2G1 mRNAの発現は、マウスMTNプロット(クロンテック社製)を用いて解析した。上記実施例2で得られた野生型、ヘテロ欠損型、及びホモ欠損型マウスのそれぞれのマウス組織からの全RNA抽出およびポリA(+)RNA精製は試薬に添付された手順書に従って行った。

【0077】即ち、野生型、ヘテロ欠損型、及びホモ欠損型マウスのそれぞれのマウス骨格筋に変性剤であるISOGEN(商品名:ニッポンジーン社製)を加えて全

RNAを抽出し、オリゴテックス-DT30 (oligotex-DT30: 宝酒造社製)を用いてポリA(+)RNAを精製した。このポリA(+)RNA 3μgをホルムアルデヒド法により電気泳動し、ハイボンドN+ (Hybond N+) ナイロン膜(アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製)へ転写した。プローブには実施例1で得られたマウスUBE2G1 cDNAの蛋白質コード領域を用いた(配列番号2)。ハイブリダイゼーション後、65°C、0.1×SSC、0.1% SDS溶液中で15分間の洗浄を2回行った後、X線フィルム(コダック社製:Kodak)に-80°Cで6.5時間露光を行うオートラジオグラフィーを行なった。

【0078】その結果、マウスUBE2G1 mRNAは骨格筋に加えて肝、腎および心などの組織でも強く発現していた(図4)。また、UBE2G1遺伝子欠損マウス骨格筋におけるmRNAの発現は、野生型、ヘテロ欠損型及びホモ欠損型のいずれにおいても認められた(図5)。しかし、UBE2G1遺伝子の第2エクソン部分はネオマイシン耐性遺伝子発現ユニットによって置換されているため欠損しており、その結果としてアミノ酸への読み替がされて、正常なUBE2G1蛋白質が産生されていないことが考えられた(図1、6)。この事は、後述する実施例7の抗UBE2G1ペプチド抗体を用いたウェスタンプロット解析において、ホモ欠損型マウスの肝ホモジネート中にUBE2G1蛋白質が検出されなかつことから、この遺伝子が破壊されていることが支持された。

【0079】実施例5 UBE2G1組換え蛋白質の調製

ヒトUBE2G1組換え蛋白質(hUBE2G1)は、pET21aベクター(ノバゲン社製:Novagen)を用いてコンピテント細胞(大腸菌) (Epicurian Coli(登録商標) BL21-Codon Plus™ (DE3)-RIL Competent Cells (ストラタジーン社製))を用いて発現させた。

【0080】C末端に6個のヒスチジン残基(Hisタグ)を付けたマウスUBE2G1組換え蛋白質(mUBE2G1-His)は、pET23aベクター(ノバゲン社製)を用いて前述の大腸菌細胞で発現した。

【0081】精製は、mUBE2G1-Hisを発現した大腸菌を10%ショ糖、1mMDTT、プロテアーゼインヒビターカクテル(シグマ社製:Sigma)を含む20mMとトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)でホモジエナライズ後、超遠心(100,000×g、30分間、4°C)して得た上清をNi-NTAスーパーflow(Super flow:QIAGEN社製)にアプライし、イミダゾールを含む緩衝液で溶出させることによって行った。かくして目的の組換え蛋白質(マウスUBE2G1-His組換え蛋白質)は、50~100mMイミダゾール画分に得られた(図7)。

【0082】実施例6. 抗UBE2G1ペプチド抗体の作製およびアフィニティー精製
上記のようにして精製したmUBE2G1-His溶液をPD-10カラム(アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製)にアプライし、0.15M NaClを含む50mMリン酸緩衝液(pH7.0)で溶出させることによってバッファー交換を行い、固定化カラムを作製した。1mM 塩酸で洗浄したNHS-活性化セファロース4ファーストフロウ(アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製)に前述のPD-10溶出液を加え、室温で30分間反応させた。次いで0.5M トリス-塩酸緩衝液(pH8.0)で十分洗浄し、同緩衝液中に4°Cで静置した。2時間後、0.5M 酢酸緩衝液(pH4.0)と0.5M トリス-塩酸緩衝液(pH8.0)で交互に6回づつ洗浄した後、十分量のダルベッコのリン酸緩衝生理食塩液(-)(D-PBS)(日水製薬社製)で洗浄し、使用時まで4°Cで保存した。

【0083】抗体作製のためには、UBE2G1遺伝子がコードする蛋白質のC末端側の126~140番目に相当する15個のアミノ酸からなるペプチド(SMLADPNGDSPANVD、配列番号8)を合成し、キャリアー蛋白質としてキーホール・リムベット・ヘモシアニン(Keyhole Limpet Hemocyanin: KLH)(Pierce社製)を結合させ抗原とした。

【0084】免疫動物には白色レグホン(メス、83日齢)2羽を用い、1回1羽当たり250μgの抗原を皮下あるいは筋肉に投与した。免疫は2週間おきに合計4回行った。4回目の免疫の1週間後に採血し、血清を調製して抗血清とした。

【0085】抗体のアフィニティー精製は、以下のようにして行った。mUBE2G1-His固定化カラムを0.1mMグリシン-塩酸緩衝液(pH2.3)で洗浄後、D-PBSで平衡化した。このカラムにD-PBSで1/10に希釈した抗血清をアプライした。吸着せずに溶出した画分を再びアプライし、十分量のD-PBSで洗浄後、カラムと同容量の0.1Mグリシン-塩酸緩衝液(pH2.3)、次いでカラム容量の半分のD-PBSで吸着した抗体を溶出させた。その際、フラクションチューブにはpHを中和するために少量の1M トリス-塩酸(pH8.0)を入れておき、溶出後、直ちに混和した。各画分についてmUBE2G1-Hisを抗原としたウェスタン

プロット解析を行い、抗体価の高い画分を回収してセントリコン-100(Centricon-100:ミリポア社製)で濃縮後、50%グリセロール溶液として-20°Cにて保存した。

【0086】実施例7. ウェスタンプロット解析
遺伝子破壊されたマウスでのUBE2G1蛋白質発現を検討するため、野生型、ヘテロ欠損型およびホモ欠損型マウスの肝臓を摘出後、直ちに液体窒素中で凍結させ、クリオプレス(Cryopress)で破碎して、1mM EDTA、1mM DTT、20%ショ糖、50倍希釈したプロテアーゼインヒビターカクテルを含む20mM トリス-塩酸(pH7.5)緩衝液とともにホモジエナライズ後、超遠心して得られた上清をDEAE-セファロースCL-4Bで分画した。組換え蛋白質を用いた実験から、UBE2G1は0.1M NaCl画分に溶出することが示されたので、マウス肝臓の同画分を回収し、上記抗体を用いてウェスタンプロット解析を行った(図8、図9)。

【0087】UBE2G1ホモ欠損型マウスではUBE2G1 mRNAの発現は認められたが、実施例4において前述するように、第2エクソン部分はネオマイシン耐性遺伝子発現ユニットによって置換されているために欠失しており、その結果としてアミノ酸への読み替がずれ、正常なUBE2G1蛋白質が産生されないことが予想された。当該実験の結果、図9に示すように、抗UBE2G1ペプチド抗体を用いたウェスタンプロット解析で、ホモ欠損型マウスの肝ホモジネートにおいてUBE2G1蛋白質は検出されず、予想通りこの遺伝子が破壊されていることが示された(図9)。

【0088】実施例8. 病理組織学的検索
野生型、ヘテロ欠損型、及びホモ欠損型のそれぞれのマウスをエーテル麻酔下で開腹、後大動脈を切開して失血死させ、臓器を摘出後に中性緩衝ホルマリンを用い冷暗所にて3日間固定した。アルコール脱水後、パラフィンに包埋して厚さ3μmの切片を作製した。ヘマトキシリソ・エオジン染色の他、必要に応じてアザンマロリー染色、鍍銀染色などの特殊染色を施した。

【0089】9~11ヶ月齢マウスの病理解剖を行った結果、ホモ欠損型マウス21例中9例で心中膜から外膜にかけて線維化が認められた(図10、図11)。しかしながら、線維巣内には、線維芽細胞が見られる炎症細胞は全く認められなかった。また、同月齢マウスにおいて、体重に対する心重量の比率はホモ欠損型マウスでは他の遺伝子型マウスよりも大きかった。さらにUBE2G1遺伝子欠損マウスの腎糸球体ではメサンギウム基質の増加が認められた(図12、図13)。

【0090】実施例9. 腎糸球体病変の評価
腎糸球体病変の評価を、下記に示すように2人の観察者の盲検によるスコア化によって行った。即ち、同一切片の腎皮質表層部に存在する糸球体をランダムに選び出し、メサンギウム領域の状態に応じて3段階に分類して

点数化した (Type 0 (図14) : 0点、Type 1 (図15) : 1点、Type 2 (図16) : 2点)。

【0091】1個体につき100個の糸球体を観察してそれらの点数を合計し、その個体のスコアとした。オス・メスとともに、野生型、ヘテロ欠損型およびホモ欠損型の3群(各群7-10個体)について評価した。得られたデータについて乱塊法モデル(要因: 遺伝子型、観察者、遺伝子型 × 観察者)による分散分析 [Huynh, H and Feldt, L. S. (1976); Estimation of the box correction for degrees of freedom for sample data in randomized block and split-plot designs.; J. Educational Statistics, 1, 69-82] を行い、群間の違いに関してはターキー(Tukey)検定 (Tukey, J.W. (1949); Comparing individual means in the analysis of variance.; Biometrika 36, 90-114)を行った。この場合の検定の有意水準は5%とし、SASソフトウェア(SASジャパン社製、R6.12)により検定した。

【0092】野生型 (+/+)、ヘテロ欠損型 (+/-) およびホモ欠損型 (-/-) の3群の腎糸球体スコアを比較すると、ホモ欠損型マウス (-/-) では、野生型マウス (+/+) やヘテロ欠損型マウス (+/-) よりも有意に高いスコアが得られ(図17)、メサンギウム領域が増加していることが示された。

【0093】実施例10 免疫組織化学的解析

マウスをエーテル麻酔下で開腹、下大動脈を切開して失血死させ、臓器を摘出後に中性緩衝ホルマリンを用いて

冷暗所にて一晩固定した。アルコール脱水後、パラフィンに包埋して厚さ3μmの切片を作製した。

【0094】抗体として、FITC標識抗マウスIgG抗体(20倍希釈、シグマ社製)、抗コラーゲン・タイプIV抗体(500倍希釈、LSL社製)、抗コラーゲン・タイプI抗体(100倍希釈、バイオジネシス社製:Biogenesis)、抗ティネシン抗体(1000倍希釈、ケミコン・インターナショナル:CHEMICON International社製)、抗デスマシン抗体(300倍希釈、ICNファーマシュティカル社製:ICN Pharmaceutical)、または抗α-平滑筋アクチシン抗体:α-smooth muscle actin(25倍希釈、ダコ社製:DAKO)を用いて、FITC標識抗マウスIgG抗体の場合は蛍光抗体法にて、その他の抗体の場合はVECTOR STAIN[®] ABCキット(VECTOR社製)を用いた酵素抗体法にて検出を行なった。

【0095】その結果、UBE2G1ホモ欠損型マウスの糸球体にはイムノグロブリンの沈着はなく、免疫複合体の沈着を機序とした炎症はこの病変には関与しないと思われた。さらにコラーゲン・タイプIV、ティネシンなどの細胞外基質が増加していること、および病変の進行した糸球体でα-平滑筋アクチシンの発現が増加していることなどから、何らかの機序によってメサンギウム細胞が活性化され、細胞外基質の産生が亢進していることが伺われた。

【0096】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd.
<120> UBE2G1 GENE DEFICIENT NON-HUMAN ANIMAL
<130> 2E400JP

<160> 9
<210> 1
<211> 170
<212> PRT
<213> Mouse
<220>
<223> Ubiquitin Binding Enzyme (UBE2G1)
<400> 1
Met Thr Glu Leu Gln Ser Ala Leu Leu Arg Arg Gln Leu Ala Glu
1 5 10 15
Leu Asn Lys Asn Pro Val Glu Gly Phe Ser Ala Gly Leu Ile Asp Asp
20 25 30
Asn Asp Leu Tyr Arg Trp Glu Val Leu Ile Ile Gly Pro Pro Asp Thr
35 40 45
Leu Tyr Glu Gly Gly Val Phe Lys Ala His Leu Thr Phe Pro Lys Asp
50 55 60
Tyr Pro Leu Arg Pro Pro Lys Met Lys Phe Ile Thr Glu Ile Trp His
65 70 75 80
Pro Asn Val Asp Lys Asn Gly Asp Val Cys Ile Ser Ile Leu His Glu

85	90	95
Pro Gly Glu Asp Lys Tyr Gly Tyr Glu Lys Pro Glu Glu Arg Trp Leu		
100	105	110
Pro Ile His Thr Val Glu Thr Ile Met Ile Ser Val Ile Ser Met Leu		
115	120	125
Ala Asp Pro Asn Gly Asp Ser Pro Ala Asn Val Asp Ala Ala Lys Glu		
130	135	140
Trp Arg Glu Asp Arg Asn Gly Glu Phe Lys Arg Lys Val Ala Arg Cys		
145	150	155
Val Arg Lys Ser Gln Glu Thr Ala Phe Glu		
165	170	
<210> 2		
<211> 510		
<212> DNA		
<213> Mouse		
<220>		
<223> Ubiquitin Binding Enzyme (UBE2G1)		
<400> 2		
atgacggagc tgcaagtggc gctgtactg cgaagacagc tggcagaact caacaaaaat 60		
ccagtggaaag gcttttcaagc aggttaata gacgacaatg atctctatcg ttggaaagtc 120		
cttattattg gtcctccaga tacactttt gaaggtggtg ttttaaggc tcatactca 180		
ttcccaaaag attatccctt ccggccctct aaaaatggaaat tcattacaga gatttggcac 240		
ccaaatgttg ataaaaatgg tgatgtttgc atttttattt ttcattgagcc tggggaggat 300		
aaatatggtt atgagaagcc agaggaacgc tgggttaccta tccatactgt gaaaccatc 360		
atgattatgt tcattttatcg gtcggcagat cctaatggag actcacctgc aatatgttagat 420		
gtcgcaaaag aatggagggg agacagaaaac ggagaattta aaaggaaaatg tggccgctgt 480		
gtaaagaaaaa gccaagaaaac tgcttttag 510		
<210> 3		
<211> 1274		
<212> cDNA		
<213> Mouse		
<220>		
<221> CDS		
<222> (399)...(908)		
<223> Ubiquitin Binding Enzyme (UBE2G1)		
<400> 3		
gaggggctgg gctagcagga gtgtgtttc tgaaggaggc aggttcatgt cgtttgcgcg 60		
gagccggccct gcgcgcgtg acgcagtgcc gggggaaaggc accgggtggg cgcacggcgc 120		
ggcagaggag ggaagcgggc gacgcgaatgc ccagatgcgc gccgcggcgg cccgggtacc 180		
ctctccttcc gggcgltgagg cgctgagcga gaaaaaggaaa gccgagcggag atcttcgcatt 240		
aggcggcggag gtgttttcg ggtctccaa gaccggctc cccggggctt cggcgctccg 300		
gtccgggttc ctcaacacac atcttagtc tccaggcggc agatgtgtc gccagtcgg 360		
cgaagtcccg gtggcgcccc gggcttcgg tggggaggat gacggagctg cagtcggcgc 420		
tgtacttcg aagacagctg cggaaactca aaaaaatcc agtggaaaggc ttttcagcag 480		
gtttataga cggaaatgtat ctctatcggtt gggaaatgttatttattgtt cctccagata 540		
cactttatga aggtgggtt tttaaaggctc atctcaactt cccaaaaatgat tttccctcc 600		
ggccctctaa aatgaaattc attacagaga ttggcaccc aatgttgat aaaaatgggt 660		
atgtttgcatt ttcttattttt catgagcctg gggaggataa atatggttat gagaagccag 720		
aggaaacgcgtg gttacctatc catactgtgg aaaccatcat gattgtgtc atttctatgc 780		
tggcagatcc taatggagac tcacctgcaa atgttagatgc tggcggaaagaa tggaggaaag 840		

acagaaaacgg agaatttaaa agggaaaggtg cccgctgtgt aagaaaaaagc caagaaaactg	900
cttttgagtg atgttttattc aatagtttgt aacttcactt atttcagggt ctccaattga	960
gaaacatggc actgttttc ctgcactcta cccacctatt gctggacttc tggtgtata	1020
agttggcaag ctctggctgg aactgggctg caataaaaaca tgccagtcataatgtgac	1080
aagagectaa caagtccaa ctaaagatga ttacgcattt tgaattctaa tgaactgttt	1140
taactttcag gaagaattgt aaagacatgt acatgcaca acatgatccg gataalatat	1200
atactgttca tgtacatcca caaacacacc ttgtaccaaa taatgttcc ttgttagtata	1260
ataagaatcg tgta	1274
<210> 4	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<221> primer	
<223> primer 423A12P7	
<400> 4	
ctgaaggagg caggttcattg t	21
<210> 5	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<221> primer	
<223> primer 423A12P8	
<400> 5	
tggtacaagg tgtgtttgtg g	21
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<221> primer	
<223> primer M423A12RH-P3	
<400> 6	
gacaatgtc tctatcgttg	20
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<221> primer	
<223> primer M423A12RH-P6	
<400> 7	
tgtttacata taacctcacc	20
<210> 8	
<211> 15	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<221>	

<223> Antigen
<400> 8
Ser Met Leu Ala Asp Pro Asn Gly Asp Ser Pro Ala Asn Val Asp
1 5 10 15

【図面の簡単な説明】

【図1】UBE2G1野生型(intact)と欠損型(mutant)の遺伝子の構造図である。

【図2】図Aは、UBE2G1野生型(Intact Allele)と相同組換えによる欠損型(Mutant Allele)及びターゲティングベクター(Targeting vector)の構造図である。また、図Bは、実施例3においてUBE2G1遺伝子欠損マウスの遺伝子型(野性型(+/+))、ヘテロ欠損型(+/−)、ホモ欠損型(−/−)を判定した結果を示す図である。

【図3】野性型マウス(+/+)、UBE2G1遺伝子ヘテロ欠損型マウス(+/−)、UBE2G1遺伝子ホモ欠損型マウス(−/−)の体重の変化を経時的にみた図である。図Aは雌マウス、図Bは雄マウスの結果である。

【図4】マウスの各種組織におけるUBE2G1 mRNAの発現図を示す。

【図5】UBE2G1遺伝子欠損マウス骨格筋におけるmRNAの発現を、それぞれ野生型マウス(+/+)、ヘテロ欠損型マウス(+/−)、及びホモ欠損型マウス(−/−)についてみた結果を示す図である。

【図6】UBE2G1遺伝子ターゲティングにより生じた変異アミノ酸配列と正常アミノ酸配列とを比較した図である。

【図7】マウスUBE2G1-His組換え蛋白質の精製の程度を示す電気泳動像を示す図面である。

【図8】抗UBE2G1ペプチド抗体によるマウス肝臓

DEAE画分のUBE2G1の検出結果を示す図面である。

【図9】UBE2G1野生型(wild)、ヘテロ欠損型(hetero)、及びホモ欠損型(KO)マウスについて、UBE2G1分子の発現の有無を示す図である。

【図10】UBE2G1ホモ欠損型マウスの心臓横断面の組織図である。

【図11】UBE2G1ホモ欠損型マウスの心臓横断面の拡大組織図である。

【図12】UBE2G1野生型マウス(9ヶ月齢)の腎糸球体横断面の強拡大組織図である。

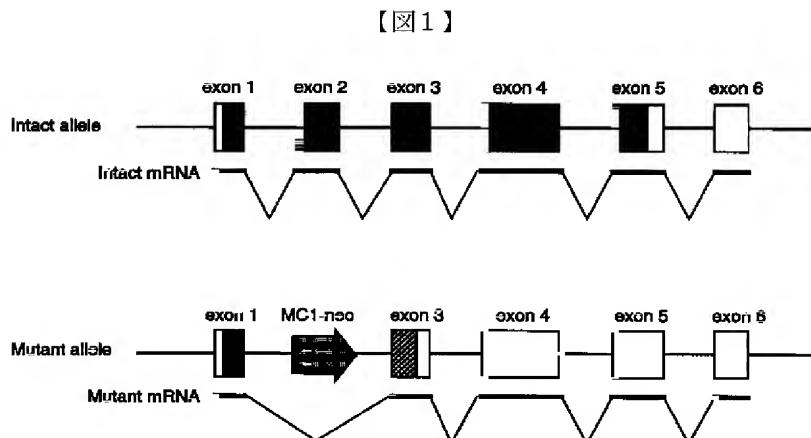
【図13】UBE2G1ホモ欠損型マウス(9ヶ月齢)の腎糸球体横断面の強拡大組織図である。

【図14】正常な腎糸球体を示す(Type0:スコア0点)、マウスの腎糸球体横断面の組織図である。

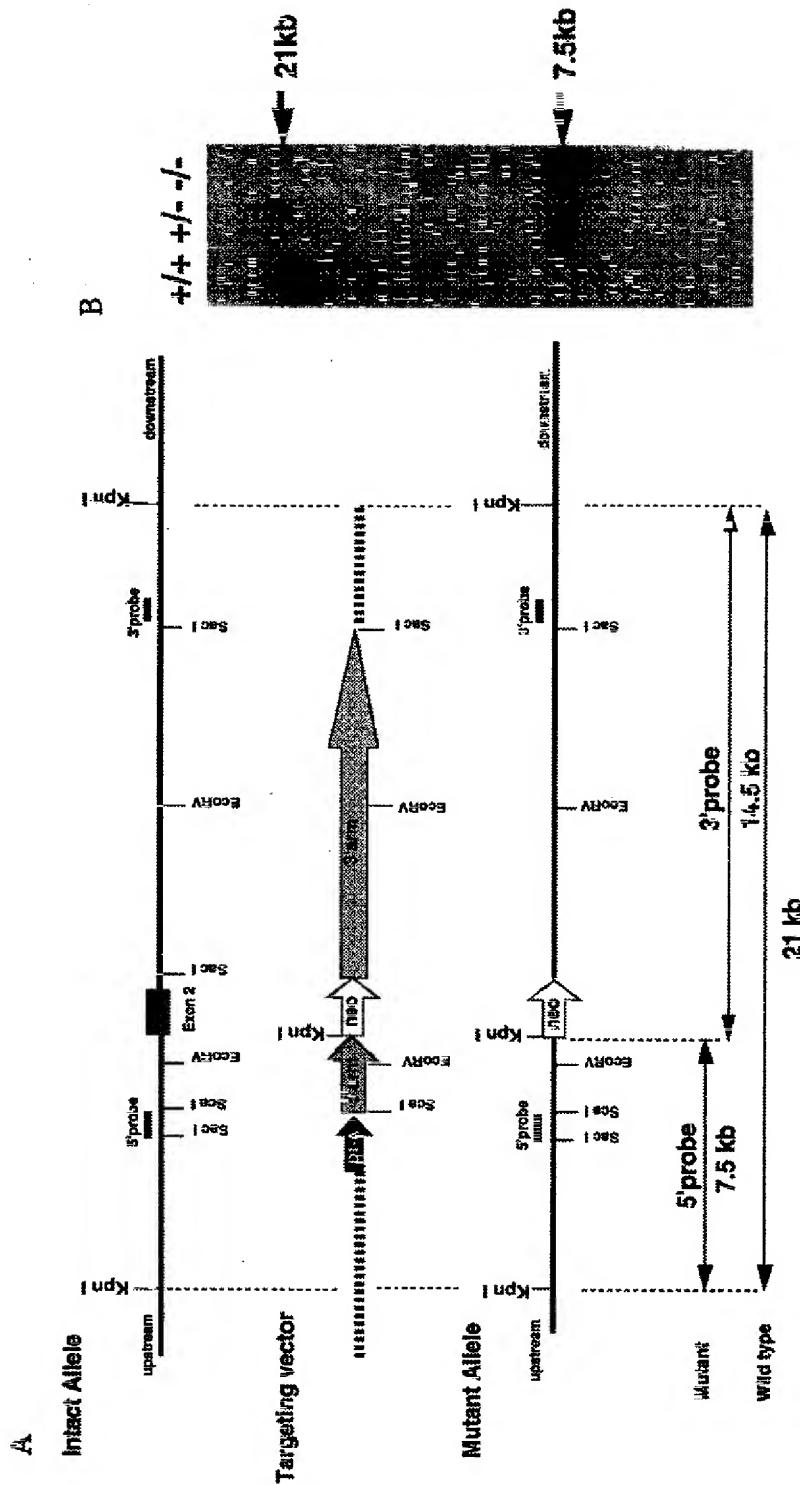
【図15】腎糸球体の部分的なメサンギウム基質の増殖を示す(Type1:スコア1点)、マウスの腎糸球体横断面の組織図である。

【図16】腎糸球体の全体的なメサンギウム基質の増殖を示す(Type2:スコア2点)、マウスの腎糸球体横断面の組織図である。

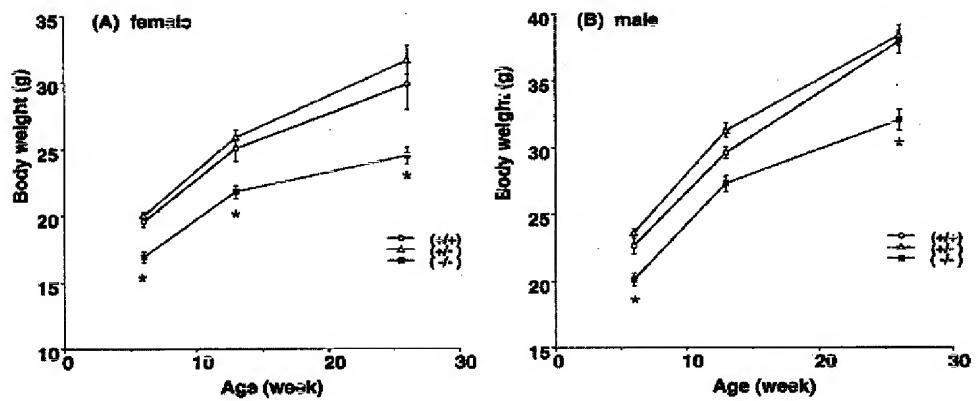
【図17】UBE2G1野生型(+/+)、ヘテロ欠損型(+/−)、及びホモ欠損型(−/−)マウスについて、腎糸球体病変のスコアを比較した結果を示す図である。図Aは雌マウス、図Bは雄マウスの結果である。



【図2】

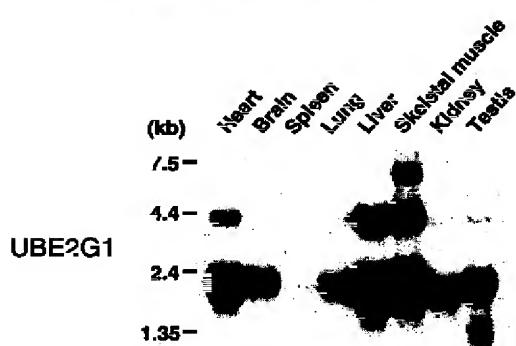


【図3】



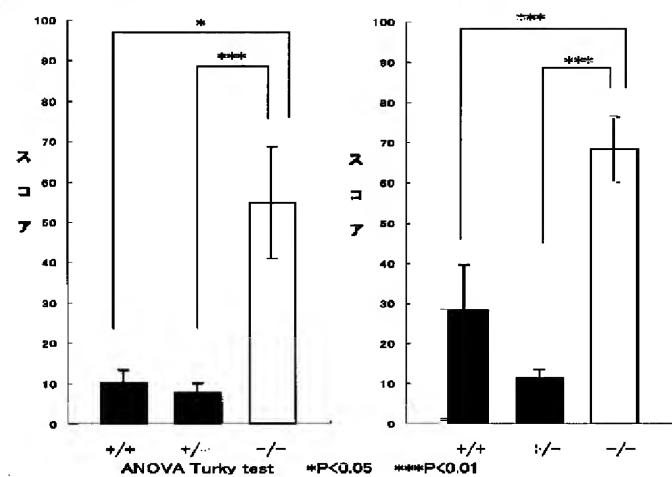
【図4】

マウス各種組織における UBE2G1 mRNA の発現



【図17】

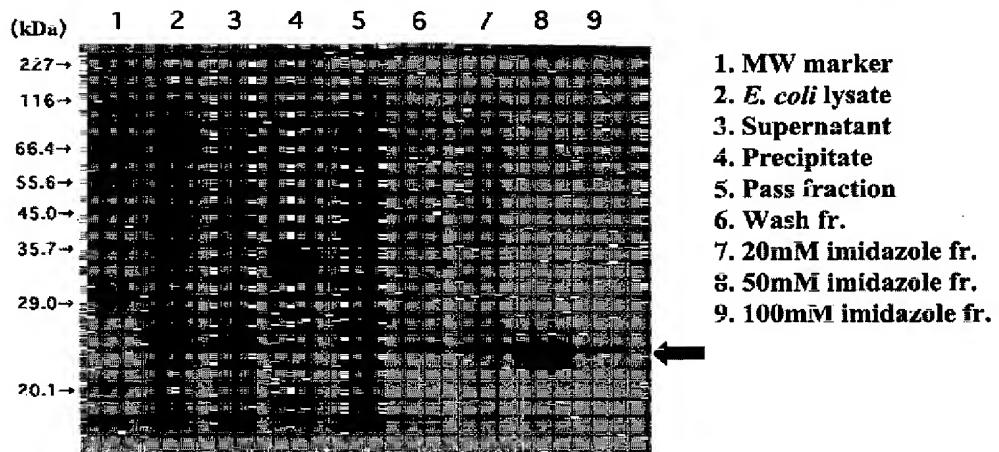
A [Female] B [Male]



【図6】

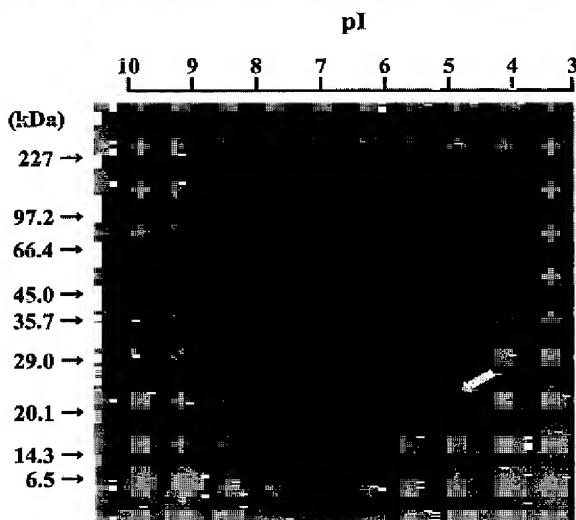
【図7】

マウスUBE2G1-His組換え蛋白質の精製



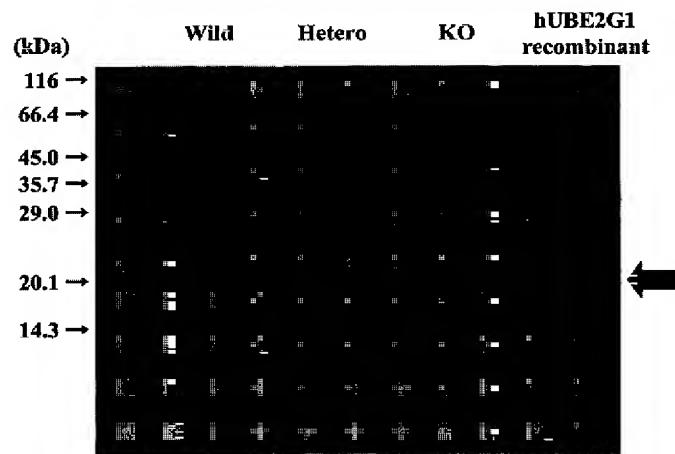
【図8】

抗UBE2G1ペプチド抗体によるマウス肝臓DEAE画分のUBE2G1の検出

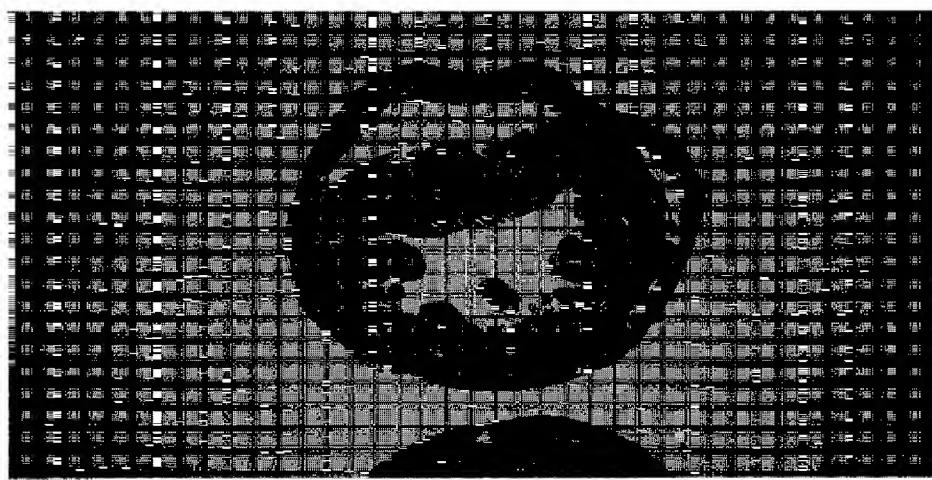


【図9】

UBE2G1 wild, hetero, KOマウスのUBE2G1分子の発現解析

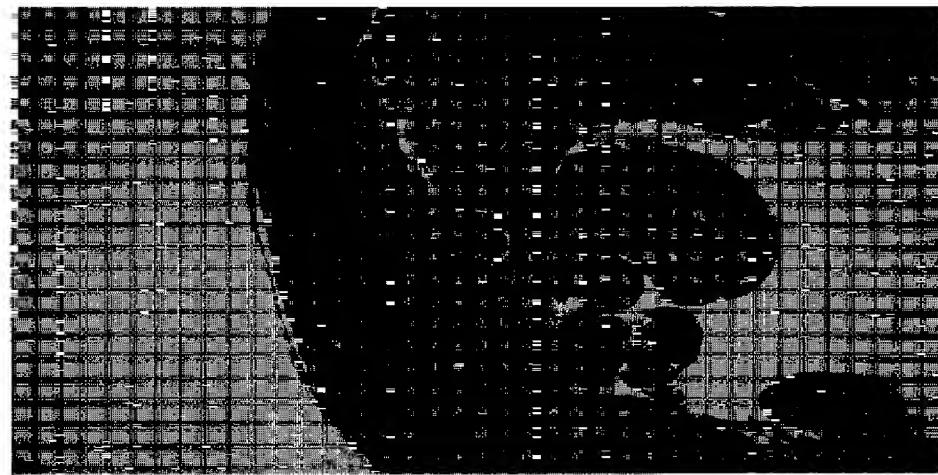


【図10】

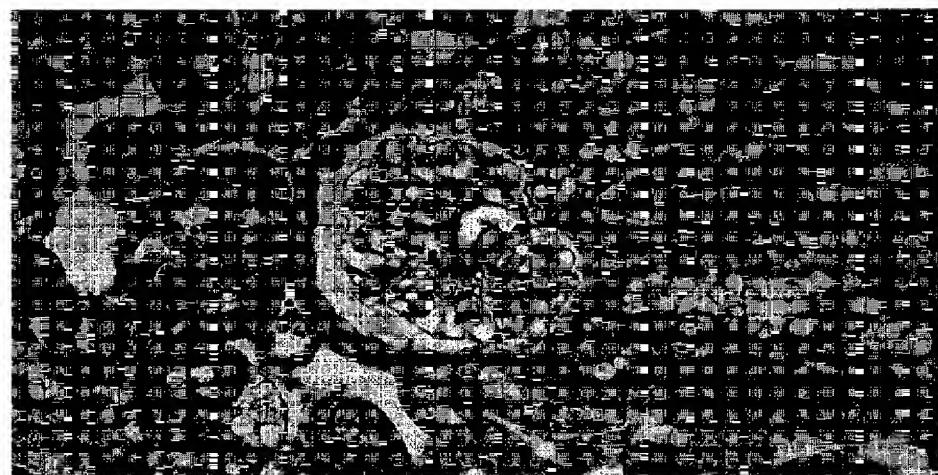


(21) 02-119170 (P2002-119170A)

【图11】

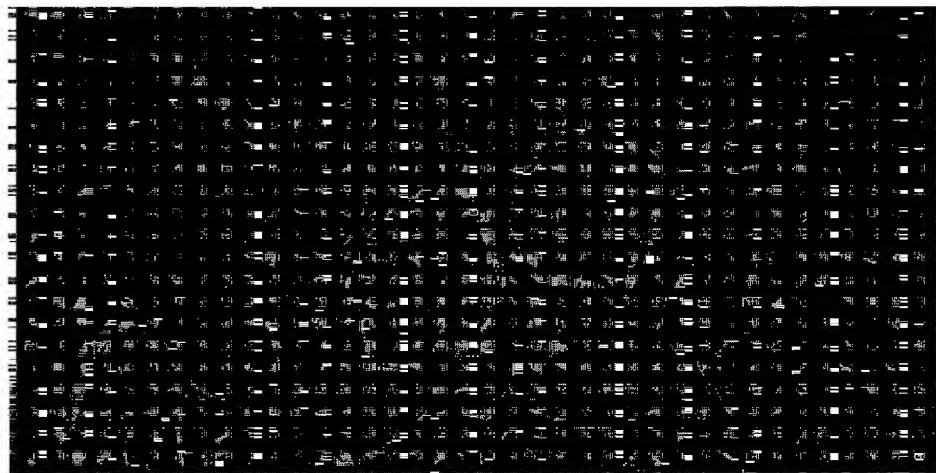


【图12】



(22) 02-119170 (P2002-119170A)

【図13】



【図14】



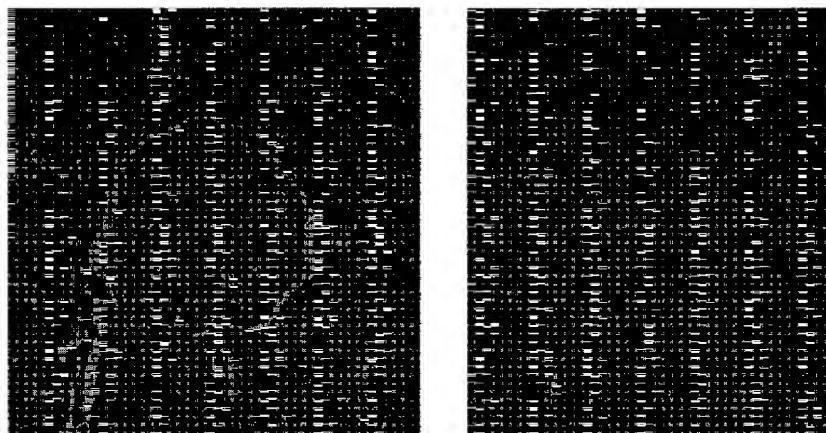
Type 0

【図15】



Type 1

【図16】



Type 2

フロントページの続き

(72)発明者 急式 弘之
徳島県徳島市川内町鶴島377-1-1301
(72)発明者 新美 正史
徳島県徳島市川内町金岡5-1ラフォーレ
2-107
(72)発明者 奥山 啓司
徳島県徳島市川内町大松900-16
(72)発明者 谷口 吉弘
徳島県徳島市川内町金岡5-1ラフォーレ
2-706

(72)発明者 古関 敦孝
徳島県徳島市川内町沖島284-2-502
(72)発明者 鳴田 良和
徳島県鳴門市撫養町木津字前川屋556-3
-201
(72)発明者 和田津 貴史
徳島県鳴門市里浦町里浦字花面282-5
F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA07 CA04 DA02
HA11
4B050 CC03 DD07 LL03